пространение у всех пород, что способствует сохранению диффузно-мозаичных природных очагов зооноза. Все породы охотничьих собак оказались зараженными Ech. granulosus с экстенсивностью инвазии от 30,0 до 70,0% при вариации количества яиц цестоды 28,4±7,83 - 65,3±6,77 экз./г фекалий.

РЕЗЮМЕ

Все 11 пород охотничьих собак и их помеси оказались зараженными Ech. granulosus с экстенсивностью инвазии 30,0-70,0%. Эхинококкозом больше инвазированы взрослые особи пород русский охотничий спаниель, немецкая короткошерстная легавая и помеси (ЭИ-70,0%) при вариации количества яиц цестод 52,8±4,36 - 63,4±5,24 экз./г фекалий.

SUMMARY

The resumes all 11 species hunting dogs and their cross-breed proved to be infected Ech. granulosus with the extensiveness invasion 30,0-70,0%. To echinococcosis comparatively more greatly are invaded the adult individuals species Russian hunting spaniel, German short-haired leave and cross-breeds (EI-70,0%) with a variation in the quantity eggs cestodes 52,8 ±4,36 - 63,4 ± 5,24 ekz./g feces.

Литература:

1. Беляев Е.В. Эпизоотологические особенности эхинококкоза охотничьих собак в южном регионе РФ//Вестник ветеринарии. – Ставрополь.- 2003. – с. 27-29 с.
2. Жарова В.М. Эпизоотология эхинококкоза охотничьих собак в Казахстане//Изв. Ин-та зоологии АН Каз. ССР. - Алма-Ата. - 1979.- Вып. 48. - С. 40-43.
3. Осипов Д.О. Популяционная структура гельминтофауны охотничьих собак при смешанных инвазиях// Ветеринарная патология. - 2003.- № 2. - С.50-53.
4. Решкой В.С. Эхинококкоз охотничьих собак в Южном Урале. // Науч. труды Омского вет. ин-та. -1989. - Т. 27. - Вып. 2. - С. 198-201.
5. Салов М.К. Зоонозы охотничьих собак в Костромской области// Мат. науч.- практ. конф. ВОГ - 1999 - С. 220-223.

УДК: 619:616.981.42:616.9

А.Л. Воробьев

(Восточно-Казахстанский государственный технический университет им. Д. Серикбаева Министерства образования и науки Республики Казахстан)

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА САПРОФИТНЫХ ВАРИАНТОВ БРУЦЕЛЛ

Ключевые слова:

Без учета лабильности биологических признаков возбудителей заболеваний не могут быть поняты многие проблемы эпидемиологии и течения инфекционных болезней. Особенно быстро трансформируются микробы в макроорганизме и, если бы такие микробы не выработали в процессе эволюции способность быстро изменяться, приспосабливаясь к меняющимся условиям существования, они не смогли бы выжить. При пассажах патогенных микроорганизмов через резистентные организмы происходит сапрофитизация возбудителя. При этом увеличивается интенсивность репродукции, снижается ферментативная активность, возрастает устойчивость к различным воздействием факторов внешней среды. Во внеэпидемическое время возбудители различных заболеваний могут сохраняться в виде маловирулентных форм в организме достаточно стойких к ним людей и животных (1).

М.М. Ременцова и др. (2) изучая бруцелл, выделенных от нетиповых хозяев установили, что они часто не укладываются в характерные для патогенных форм дифференциальные тесты, вплоть до полной сапрофитизации. Авторы предполагают, что возбудитель бруцеллеза ведет свое происхождение от сапрофитических организмов, а паразитизм бруцелл является одной из форм существования. Облигатными паразитами бруцеллы стали для сельскохозяйственных животных, факультативными для домашних, диких и человека.

Сапрофитическое существование патогенных бактерий в окружающей среде зависит от комплексного воздействия абиотических и биотических факторов среды обитания, которые проявляются различной степенью адаптации патогенных бактерий. Процессы адаптации сопровождаются изменением морфологии и физиологии клетки, в частности, снижением их ферментативной активности к ряду субстратов, а также гетероморфизмом, что

способствует уменьшению энергии роста микроорганизмов. Происходящие изменения являются «камнем преткновения» для правильной идентификации возбудителей инфекционных болезней, выделяемых из окружающей среды (3).

По мнению Б.Ф. Резникова и др.(4) с помощью используемых на практике диагностических S- и R-сывороток невозможно идентифицировать выделяемые из патологического материала полевые штаммы бруцелл с глубокой степенью диссоциации. По данным авторов от абортированных коров в очагах бруцеллеза выделяют до 4% таких штаммов. Фактически глубокодиссоциированные штаммы, вероятно, изолируют гораздо чаще, но из-за отличия от хорошо изученных бруцелл в S- и R- форме, их принимают за постороннюю микрофлору.

Сапрозоонозы – большая группа переходных форм бактерий, относящихся к паразитам, которые обладают двойственной (сапрофитной и паразитической) природой, постоянно используют обе среды обитания, непрерывно осуществляя циркуляцию между ними. Жизненная программа таких видов состоит в непрерывном переходе из окружающей среды, где они ведут сапрофитический образ жизни, в теплокровный организм, в котором они проявляют свои патогенные свойства, вызывая инфекционный процесс, и снова реверсируют к сапрофитизму при выведении из теплокровного организма в окружающую среду. Наличие двух сред обитания, в которых подобные возбудители инфекций могут размножаться и длительно существовать, способствует сохранению их в биосфере и определяет их дальнейшую эволюцию в этом направлении. Длительная адаптация возбудителей сапрозоонозов к организму теплокровных животных не могла не способствовать формированию генетическо-биохимических механизмов, если бы они не были нужны для обеспечения существования бактерий в таких различных условиях существования, как внутренняя среда теплокровного организма с ее постоянной температурой и богатой трофикой и окружающая среда с ее относительно низкой и непрерывно изменяющейся температурой и бедной трофикой (5).

Как известно, в возникновении всякого инфекционно-патологического процесса главную роль играют продукты жизнедеятельности микроорганизмов, образование которых зависит от типа обмена веществ возбудителя, катализируемого специфическими ферментами. Энзиматический аппарат бактериальной клетки является основой всей ее жизнедеятельности. Все процессы обмена и базирующиеся на них патогенность и антигенная структура зависят от набора и локализации ферментов (6).

В процессе своей жизнедеятельности бруцеллы разлагают белки, пептоны, аминокислоты с образованием аммиака при участии ферментов уреазы и дезаминаз. При бруцеллезной инфекции у людей и животных количество аммиака в крови повышается в 3-7 раз против нормы. Исследуя токсичность аммиака в опытах на животных установили, что аммиак является тем токсином, которых определяет патогенность бруцелл как вида в целом, а вирулентность отдельных штаммов зависит не только от их диссоциации, но и степени активности уреазы и дезаминаз (7,8,9).

Известно, что аммиак является ядом как для макро-, так и микроорганизмов. В этой связи целью нашей работы являлось изучение свойств бруцелл после воздействия на них аммиаком.

Материалы и методы

В опыте использовали штаммы бруцелл разных видов и степени изменчивости: B.abortus 544 и 19, B.melitensis 16M, B.suis 1330, B.canis 1066, B.ovis 63/290 и глубокодиссоциированные штаммы – 734 и 726, выделенные от крупного рогатого скота и свиньи В.И.Белобабом (10)

Для изучения влияния аммиака на бруцеллы пользовались его солью – хлористым аммонием (NH_4CL), постепенно увеличивая концентрацию последнего в питательном бульоне (1 мг/см^3, 2, 3, 5, 10, 15 и т. д. до 60 мг/см^3). Бруцеллы выращивали при 37 С до появления видимого роста, затем пересевали в бульон со следующей концентрацией хлористого аммония. В дальнейшем репродукцию бруцелл осуществляли на питательном агаре без хлористого аммония (4).

Биологические свойства бруцелл изучали по методике, рекомендованной ФАО/ВОЗ (11).

Ферментативную активность бруцелл определяли по методу Б.Ф. Резникова (8).

Фаготипирование проводили специфическими фагами ТБ и АВ (фаг, лизирующий диссоциированные формы бруцелл) (12).

Результаты и обсуждение

Первые генерации используемых в опыте штаммов бруцелл в жидких питательных средах, содержащих начальную концентрацию 1-5 мг/см^3 хлористого ам-

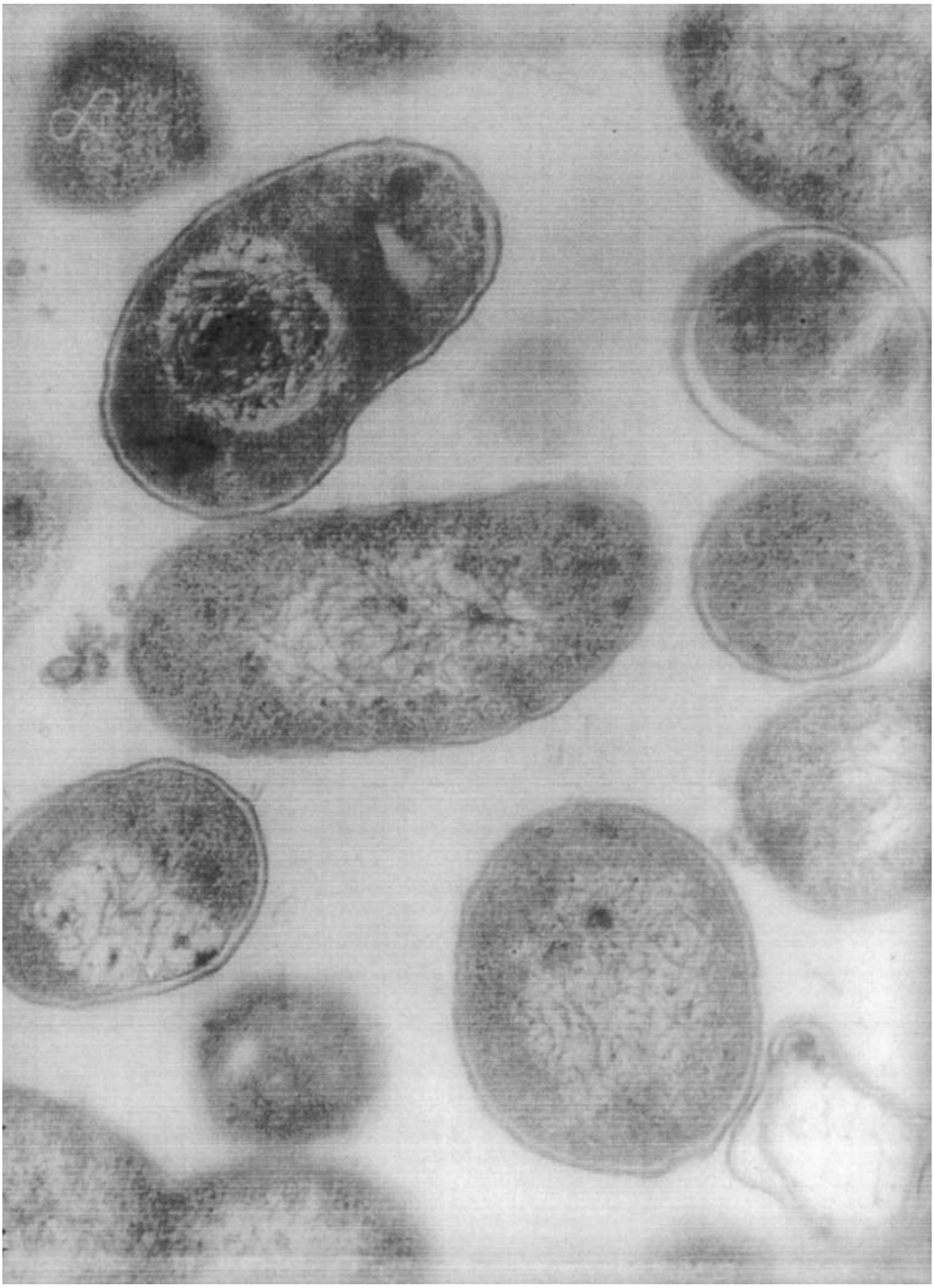


Рис. 1. Клетки бактерий штамма B. abortus 19N сапрофитной формы. Увеличение – 10000.

мония, наблюдали на 7-10 сутки инкубации при 37° С. После адаптации бруцелл концентрацию хлористого аммония постепенно доводили до 30-60 мг/см^3 питательного бульона. Скорость роста при этом стабилизировалась и составила 3-4 суток. Отмечено, что увеличение содержание препарата более 30 мг/см^3 не усиливает трансформирующего эффекта. После достижения в среде предельной концентрации хлористого аммония бактерии стали культивировать на эритрит-агаре без хлористого аммония при 37° С.

Селекционированные нами штаммы обозначены: 19N, 544N, 16MN, 1330N, 63/290N и 1066N. Все подвергнутые воздействию хлористого аммония штаммы бруцелл имели идентичную характеристику:

микробные клетки овоидной и палочковидной формы, увеличены по сравнению с типичными бруцеллами в 3-5 раз, размером 3,5-5 мкм (рис.1), грамотрицательны, по Козловскому окрашивались в красный цвет. Культуры агглютинировались водным раствором трипафлавина (1:500). Реакция термоагглютинации – отрицательная.

Бруцеллы, после 1-3 пассажей на средах с хлористым аммонием, утратили уреазную и оксидазную активность, последняя в неполной мере могла восстанавливаться. Измененные штаммы хорошо росли на средах с тионином (1:25000) и фуксином (1:50000). Колонии величиной 5-10 мм в диаметре, плоские, прозрачные с желтоватым оттенком, ровными краями и концентрической исчерченностью. По Уайт-Вильсону окрашивались в синий цвет с желтым центром. Специфическими фагами ТБ и АВ не лизировались. Хорошо растут на обычных для бруцелл питательных средах при температуре 18-41°С, вызывая окисление среды и образование газа (вероятно, CO_2), видимый рост наблюдается через 16-24 часа. На агаровых средах, содержащих хлористый аммоний, растут без образования газа. Агглютинируются гомологичной иммунной сывороткой и дают отрицательные показания с сыворотками, полученными против S- и R- вариантов бруцелл. Аналогичной характеристикой обладали эпизоотические штаммы – 726 и 734.

Так как по своим культурально-морфологическим, тинкториальным, антигенным и биохимическим особенностям все указанные штаммы идентичны, последующие опыты проводили только с измененным штаммом 19N.

При внутрикожном введении морским свинкам 2 млрд взвеси бруцелл штамма 19N в дозе 0,1 см^3 изменений на месте иньекции не наблюдали. При подкожном введении морским свинкам 50 млрд микробных клеток и кроликам подкожно или внутривенно 50-100 млрд образуется слабая припухлость на месте иньекции. Через 7 дней после заражения выделить бруцелл из внутренних органов не удалось, патологических изменений во внутренних органах не обнаружили.

Аллергическая проба бруцеллином ВИЭВ на морских свинках, зараженных указанным штаммом - отрицательная.

Таким образом, глубокодиссоциированный штамм бруцелл 19N, идентичные ему по биологическим признаком штаммы, измененные хлористым аммонием и эпизоотические, выделенные из биоматериала от животных отличаются от всех известных высоко- и слабопатогенных штаммов бруцелл в S- и R- форме полной утратой вирулентности и способности приживаться во внутренних органов животных, ростом при комнатной температуре, отсутствием уреазной и дезамиазной активности и характерной особенностью указанных штаммов к образованию газа и подкислению питательной среды. Последнее обстоятельство согласуется с данными Е.А. Драновской (13), которая сообщает о том, что бруцеллы обладают активными дезаминазами. Это делает бруцеллы способными разлагать пептоны среды, причем, образующийся в процессе дезаминирования аминокислот аммиак, может нейтрализовать кислоту и газ, выделяющийся в том или ином количестве при утилизации углеводов бруцеллами разных видов. Но так как бруцеллы, измененные действием хлористого аммония, продуцируют аммиак в малом количестве или совсем его не выделяют, нейтрализация газа и кислоты аммиаком у них не происходит или протекает в неполной мере.

Все вышеизложенное ставит на одно из первых мест проблемы, непосредственно связанные с идентификацией глубокодиссоциированных (сапрофитных) вариантов бруцелл. Поэтому представляется целесообразным изучить возможность идентификации глубокодиссоциированных культур бруцелл с помощью гомологичных фагов, т.к. фагодиагностика является высокоспецифичным и достоверным тестом.

Лизогенизацию измененных хлористым аммонием штаммов бруцелл осуществляли по предложенному нами способу следующим образом: бруцеллы каждого штамма высевали в питательный бульон, содержащий 10 ЕД пенициллина в 1,0 см^3 и выращивали в термостате (37 С) до появления видимого роста, проявляющегося в помутнении бульона и образовании пристеночного кольца (обычно 3-7 суток). Выросшую культуру отсевали в бульон с 50 ЕД пенициллина в 1,0 см^3, затем со 100, 250, 500, 1000, 1500, 2000, 2500 и 3000 ЕД/см^3. В результате последовательных пересевов бруцеллы переходили в лизогенное состояние. Критерием лизогенизации служил появившийся у бактерий признак слизеобразования и врастания бактериальной массы в питательный агар (14).

На рис. 2 показан электронно-микроскопический снимок сапрофитного

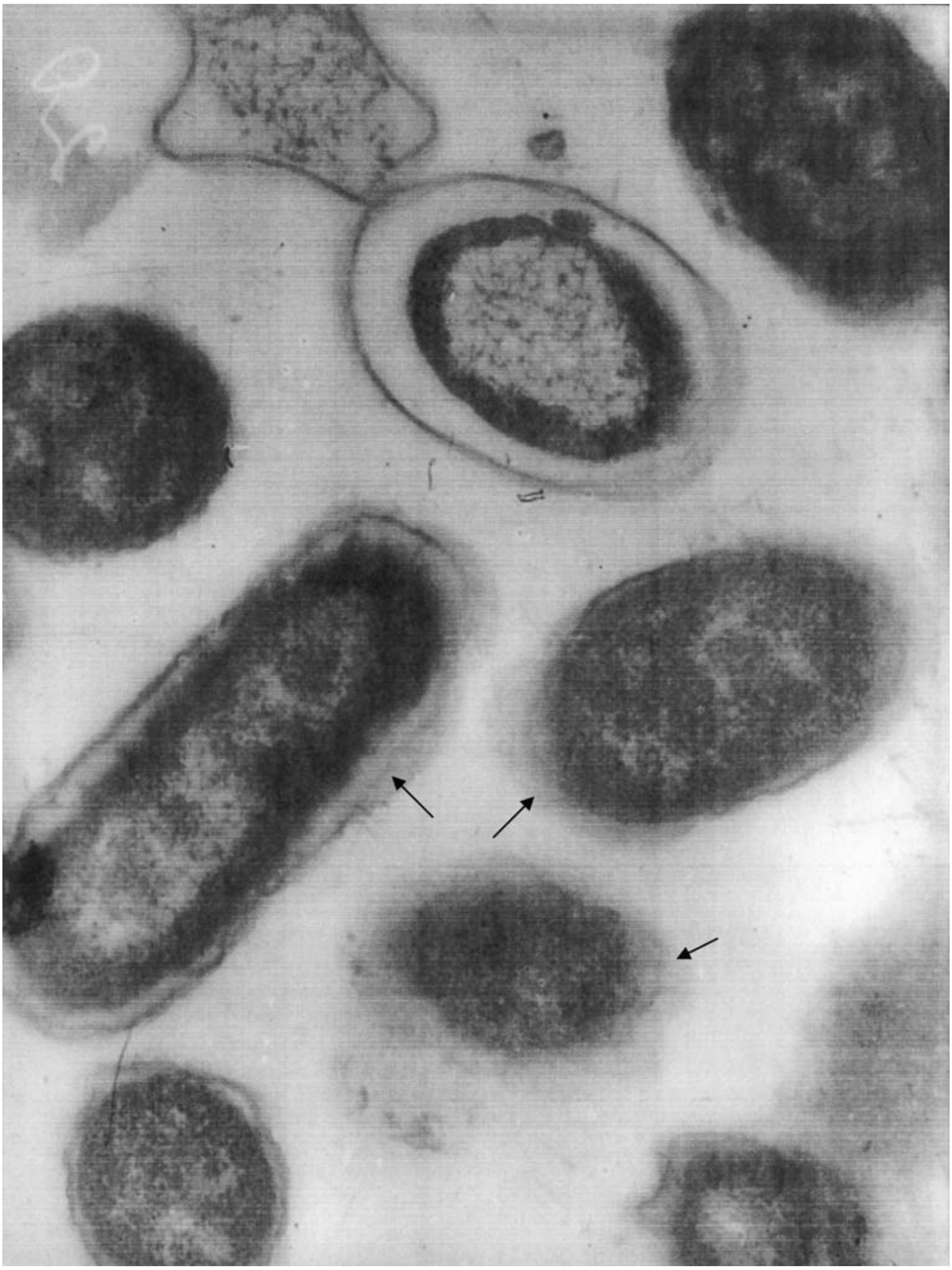


Рис. 2. Клетки бактерий штамма B. abortus 19N сапрофитной формы после воздействия пенициллина. У отдельных бактерий наблюдается полное или частичное отсутствие клеточной стенки (показано стрелками). Увеличение – 10000.

штамма B.abortus 19N после воздействия пенициллина. Наблюдается полное или частичное отсутствие клеточных стенок, т.е. процесс L-трансформации.

В дальнейшем лизогенные культуры бруцелл пересевали в питательный бульон (50,0 см^3), инкубировали в термостате (37° С) – 3-4 суток, подвергали фильтрации через керамический фильтр и в фильтрате определяли наличие фага путем нанесения капли фильтрата на газон с индикаторными штаммами. По характеру лизиса штаммы бруцелл оценивали как высокочувствительные к фагу, чувствительные и резистентные.

Для выявления фагов глубокодиссоциированные штаммы бруцелл, селекционированные под влиянием хлористого аммо-

Таблица

Литический спектр фагов, изолированных из сапрофитных форм бруцелл

Штаммы бруцелл	Штаммы фагов					
	19NФ	16MNФ	1330NФ	1066NФ	Тб	АВ
B.abortus 544	+	+	+	+	+	-
B.melitensis 16M	+	+	+	+	-	-
B.suis 1330	+	+	+	+	+	-
B.ovis 63/290	-	-	-	-	-	+
B.canis 1066	-	-	-	-	-	+
Сапрофитные формы						
544N	+	+	+	+	-	-
19N	+	+	+	+	-	-
16MN	+	+	+	+	-	-
1330N	+	+	+	+	-	-
63/290N	+	+	+	+	-	-
1066N	+	+	+	+	-	-
734	+	+	+	+	-	-
726	+	+	+	+	-	-

+ наличие лизиса, - отсутствие

ния, лизогенизировали воздействием пенициллина. В результате в лизогенное состояние перешли все используемые в опыте штаммы бруцелл. Литическая активность выделенных фагов оказалась низкой. Видимый лизис наблюдали только при нанесении нативного фага. При посеве смеси фаг-бруцеллы на плотные питательные среды появились негативные колонии фага, обладающие значительным полиморфизмом – от мелких, точечных до крупных, размером 3-5 мм в диаметре. Часто на дне негативных колоний регистрировали рост вторичных культур бруцелл. Для усиления активности фаги пассировали на чувствительных культурах. Обычно через 5-10 пассажей титр фагов достигал 10^{-5} – 10^{-8}.

При изучении литического спектра фагов установили, что все они способны лизировать сапрофитные формы бруцелл и отщеплять мутанты, образующие негативные колонии на референтных штаммах в S-форме: B.abortus 544, B.suis 1330 и B.melitensis 16M. Диссоциированные штаммы B.ovis 63/290 и B.canis 1066 оказались к ним резистентными.

Однако в дальнейшем, через несколько пассажей (4-5) на бруцеллах, различной степени изменчивости, у изолированных бактериофагов появилась способность к лизису некоторых диссоцированных штаммов бруцелл разных видов.

Далее эксперименты проводили с «чистыми» линиями фагов, отобранных путем последовательных пассажей морфологически однородных негативных колоний. Селекционированные фаги, в зависимости от штаммов из которых они были изолированы, обозначены: 19NФ, 16MNФ, 1330NФ, 1066NФ. Контролем служили фаги ТБ и АВ. В опыте также использовали референтные и полученные нами сапрофитные штаммы бруцелл (табл.).

Как свидетельствуют данные табл. фаги, полученные путем селекции и скрининга из сапрофитных форм, лизировали глубокодиссоциированные варианты бруцелл.

Фаг ТБ лизировал только штаммы B.abortus и B. suis, фаг АВ – диссоциированные штаммы B.canis и B.ovis.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов были селекционированы сапрофитные варианты бруцелл, изучены их основные свойства, а также изолированы специфические фаги, способные их лизировать (15).

Использование данных фагов для фаготипирования позволит идентифицировать сапрофитные варианты бруцелл и, тем самым, усовершенствовать диагностику бруцеллеза. В качестве референтного штамма сапрофитной формы нами предложен штамм B.abortus 19N (16).

Выводы

1. Измененные воздействием аммиака бруцеллы утрачивают свою видовую характеристику и токсинообразующие фер-

менты – уреазу и дезаминазы, т.е. трансформируются в авирулентную (сапрофитную) форму.

2. Биологические свойства сапрофитных вариантов бруцелл исследованы недостаточно, идентификация их не разработана и не применяется в лабораторной практике, в этой связи изучение глубокодиссоциированных культур бруцелл, вплоть до перехода их в непатогенную реликтовую форму, имеет не только теоретическое, но и практическое значение.

РЕЗЮМЕ

Представлены результаты изучения сапрофитных вариантов бруцелл, полученных воздействием хлористого аммония и изолированных от животных, а также выделенных из них фагов.

SUMMARY

Are represented the results of studying the saprophytic versions of brucella, obtained by the action of chloride ammonium and isolated from animals. Is determined the lytic spectrum of the phages, isolated from the saprophytic forms of brucella.

Литература

1. Перетц Л.Г. Значение изменчивости микробов для эпидемиологии и клиники инфекционных заболеваний // Изменчивость микроорганизмов и бактериофагия. - М.: Медгиз, 1960. - С. 237-245.
2. Ременцова М.М., Ищанова Р.Ж. Экология возбудителя бруцеллеза // Сб. мат. Всесоюзн. научно-прак. конф. по бруцеллезу. - Алма-Ата, 1978. - С. 49-50.
3. Зуев В.С. Сапрофитизм патогенных бактерий// Ветеринарная патология.- 2004.- № 4.- С.11-16.
4. Резников Б.Ф., Воробьев А.Л. Использование штамма бруцелл № 17/4 сапрофитной формы для идентификации глубокодиссоциированных полевых штаммов бруцелл // Сб. мат. всесоюзн. науч. конф. - Омск, 1980. - С. 203-204.
5. Сомов Г.П. Современное представление о сапронозах и сапрозоонозах // Ветеринарная патология.- 2004.- № 3.- С. 31-35.

6.Губарев Е.М. Основные процессы обмена веществ у микробов.- М.: Медгиз,1961.- 493 с.

7. Габрилович И.М. Практическое пособие по бактериофагии.- Минск, 1968.-180 с. 8.Резников Б.Ф. Некоторые вопросы метаболизма бруцелл и патогенеза бруцеллеза: автореф. … канд. биол. наук. - Фрунзе, 1969. - 19 с.
9. Мельников Н.И. и др. Ферменты патогенности и токсины бактерий. - М.: Медицина, 1969. - 252 с.
10. Белобаб В.И. и др. Биологические свойства и антигенная активность Л-форм бруцелл, выделенных от животных // Инфекционные и незаразные болезни животных в Казахстане/ Сб. научн. тр.- Алма-Ата.- 1983.- С. 33-40.
11. Альтон Д., Джонс Л. Методы лабораторных исследований по бруцеллезу. - Женева, 1968. - 84 с.
12. Предпатент 14814. Казахстан. Штамм специфического бактериофага АВ, используемого для идентификации измененных форм бруцелл /А.Л.Воробьев и др ; опубл. 15.09.2004, бюл. № 9.
13. Драновская Е.А. Некоторые биохимические свойства бруцелл и их значение для дифференциации отдельных видов и таксономии рода Бруцелла // ЖМЭИ. – 1974. - №7. - С. 17-22.
14. Предпатент 14203. Казахстан. Способ лизогенизации бактерий / А.Л. Воробьев и др.; опубл. 15.04.2004, бюл. № 4.
15. Предпатент 17133. Казахстан. Способ идентификации измененных форм бруцелл / А.Л.Воробьев; опубл. 15.03.2006, бюл. № 3.
16. Предпатент 15973. Казахстан. Штамм бактерий Brucella abortus № 19 «0069В», используемый для приготовления бруцеллезных антигенов / А.Л. Воробьев; опубл. 15.07.2005, бюл. № 7.

УДК: 619:616.988.21

И.П. Арутюнова, Е.И. Будкин, О.М. Швец, И.В. Ермилов

(ФГОУ ВПО «Курская государственная сельскохозяйственная академия им. проф. И.И.Иванова», ГУ «Курская областная ветеринарная лаборатория»)

БЕШЕНСТВО АНТРОПУРГИЧЕСКОГО ТИПА – ПРОБЛЕМА БОЛЬШИХ ГОРОДОВ

Ключевые слова: бешенство, урбанизация, бродячие животные, иммунизация, регистрация собак и кошек.

Под бешенством антропургического (городского или урбанического) типа понимают эпизоотию, при которой циркуляция возбудителя инфекции осуществляется в популяции домашних плотоядных животных. Урбанизированная среда определяет своеобразие сосуществования человека и животных. Два вида животных нашли в городе пригодные для себя экологические ниши - это собаки и кошки. Они сумели приспособиться к обитанию в человеческом жилье. Собака и кошка в процессе эволюции, биологически и социально оказались наиболее приспособленными к человеку. С другой стороны, они являются для горожан возможностью непосредственно контактировать с живой природой.

Процесс дальнейшей урбанизации и социально-экономические причины порождают проблему бродячих собак и ко-